

## 原 著

Bacillus Cereus および Bacillus Licheniformis の  
芽胞形成におよぼす培養条件について

高村一知, 星野浩子, 渡部智子

Influence of Medium and Temperature on the Sporulation  
of Bacillus Genus

KAZUNORI TAKAMURA, HIROKO HOSHINO and TOMOKO WATANABE

## 緒 言

*Bacillus* 属細菌は土壌, 塵埃および水等の自然界に広く分布する好気性または通性嫌気性の芽胞形成グラム陽性かん菌で, 普通の培地によく発育し, その培養に特殊な培地を必要としないといわれている。しかし, *Bacillus* 属細菌は芽胞を形成するのが一つの特徴であるが, 芽胞形成性は菌株の継代中にしばしば失われたり, また芽胞の耐熱性や発芽は遺伝性, 培地組成, 発育温度など諸因子の影響により左右されることが知られている。

Gordon<sup>3)</sup> らは有機物を多量に含む土壌浸出液を加えた培地が芽胞形成性が高いことを報告している。また Charney<sup>2)</sup> らは  $Mn^{++}$  が *Bacillus* 属の芽胞形成を促進すると報告して以来, 多くの研究者によってその事実が確認されている。そこで, 今後の芽胞研究の基礎実験として, 芽胞形成におよぼす培養温度と芽胞形成培地について検討を行ったので報告する。

## 実 験 方 法

## I 供 試 菌 株

東京大学応用微生物研究所より分与された *Bacillus cereus* IAM 1110 および *Bacillus licheniformis* IAM 11054 と昭和57年5月に東京地区で市販されていた黒コショウより分離した

*Bacillus cereus* および *Bacillus licheniformis*<sup>7)</sup> の4菌株を使用した。*Bacillus cereus* は常法に従い同定(表3)した。

## II 芽胞形成培地

0.05% Mn 加普通寒天培地: 日水製薬(株)の普通寒天培地に特級硫酸マンガンを0.05%添加した。

0.05% Mn 加標準寒天培地: 栄研化学(株)の標準寒天培地に特級硫酸マンガンを0.05%添加した。

土壌エキス加寒天培地(表1)

ミネラル加寒天培地(表2)

以上の四種類の培地を芽胞形成培地として使用した。

表. 1 土壌エキス加寒天培地の組成

牛肉エキス	2g
酵母エキス	3g
ポリペプトン	10g
NaCl	5g
ブドウ糖	10g
寒天	20g
土壌エキス*	400ml
H <sub>2</sub> O	600ml
pH7.0	

\* 幕張本郷の畑の土壌500gに対し水1200mlを加えよく混和したのち, 60分間オートクレーブを行ない口紙で口過して用いる。

Key Words: ① *Bacillus cereus*, ② *Bacillus licheniformis*, ③ Spore, ④ Sporulation, ⑤ medium, ⑥ temperature.

表. 2 ミネラル加寒天培地の組成

肉エキス	3g
ペプトン	5g
NaCl	8g
グルコース	0.1g
寒天	20g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.08g
ミネラル液*	50ml
H <sub>2</sub> O	950ml
pH7.0	

※ミネラル液

MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1g
MgSO <sub>4</sub>	4g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.1g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01g
H <sub>2</sub> O	1000ml

## Ⅲ 芽胞懸濁液の調整

上記芽胞形成培地に供試菌株を塗抹し、35℃、45℃ および50℃ で4日間培養し、培地上に形成した菌集落に10 ml の滅菌生理的食塩水を加え、コンラージ棒を用いて菌集落を生理的食塩水に懸濁した。得られた芽胞懸濁液を冷凍遠心器8000 rpm、10分間遠心分離し、上澄を捨て、更に滅菌生理的食塩水10 ml に懸濁し遠心分離した。この操作を3回繰り返し芽胞懸濁液とした。

## Ⅳ 芽胞数測定用培地および測定方法

上記懸濁液 *Bacillus cereus* は75℃ 20分間加熱し、*Bacillus licheniformis* は80℃ 20分間加熱したのち、所要の希釈液を生菌数測定用標準寒天培地の表面に0.1 ml おとし、滅菌コンラージ棒で表面一面に塗抹し、30℃、48±3時間培養後出現した集落を数えて菌数を算定した。芽胞数は2枚の平板の平均の値をとった。

Ⅴ *Bacillus cereus* の同定法

黒コショウ10 g に滅菌生理的食塩水90 ml を加え、ワーリングブレンダーで5分間均質乳状化し、80℃ 10分間加熱したのち、その0.2 ml をセレウス菌分離用 NGKG 寒天培地に塗抹し、出現した卵黄反応陽性の集落を標準寒天培地に鉤菌し、その分離菌を前法<sup>7)</sup>に従って表3の試験を行った。

## 実験結果および考察

Ⅰ 香辛料からの分離菌株 *Bacillus cereus* の同定

*B. cereus* は10%卵黄加 NGKG 寒天培地上で円形に白濁した卵黄反応（レシチナーゼ反応）陽性を示した。香辛料中に多く検出される *B. licheniformis*, *B. subtilis* および *B. megaterium* はこの反応には陰性を示す。また、澱粉分解性が陽性であることは、*B. pumilus* 陰性と相異し、他の7% NaCl 培地での発育、運動性、VP 試験および硝酸塩の還元は陽性を示したので *Bacillus cereus* と同定した。

表. 3 香辛料からの分離菌株 *Bacillus cereus* の同定

試 験 項 目	性 状
澱粉分解性	+
7%NaCl 培地での発育	+
5%NaCl 培地での発育	+
嫌気性発育の有無	+
運動性の有無	+
V P 試 験	+
硝酸塩の還元	+
O F 試 験	+
カタラーゼ試験	+
レシチナーゼ反応	+

Ⅱ *B. cereus* の芽胞形成におよぼす温度と培地の培養条件について

表4に芽胞形成におよぼす培養温度と芽胞形成培地の芽胞菌数を示した。芽胞形成に対する培養温度の関係は、ミネラル加寒天培地が45℃で若干高い値を示しただけで、後の0.05% Mn 加普通寒天培地、0.05% Mn 加標準寒天培地および土壌エキス加寒天培地では、35℃の培養温度が10<sup>5</sup>～10<sup>6</sup>/ml 個であるのに対し、45℃、50℃では10<sup>4</sup>～10<sup>5</sup>/ml 個と低い値を示した。また、4種の芽胞形成培地間による芽胞形成数の差異については、

表. 4 *B. cereus* の芽胞形成におよぼす培養温度と培地

(1 ml中)

芽胞形成培地	供試菌株	培養温度 (°C)		
		35	45	50
0.05%Mn 加 普通寒天培地	I A M 1 1 1 0	$1.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^4$	$4.6 \times 10^4$
	分離菌株	$1.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$
0.05%Mn 加 標準寒天培地	I A M 1 1 1 0	$1.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$9.6 \times 10^4$
	分離菌株	$2.2 \times 10^5$	$3.1 \times 10^4$	$4.2 \times 10^4$
土壌エキス加寒天培地	I A M 1 1 1 0	$2.1 \times 10^5$	$3.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
	分離菌株	$3.6 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$8.6 \times 10^4$
ミネラル加寒天培地	I A M 1 1 1 0	$7.6 \times 10^4$	$9.8 \times 10^4$	$9.0 \times 10^4$
	分離菌株	$1.6 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$7.1 \times 10^4$

表. 5 *B. licheniformis* の芽胞形成におよぼす培養温度と培地

(1 ml中)

芽胞形成培地	供試菌株	培養温度 (°C)		
		35	45	50
0.05%Mn 加 普通寒天培地	I A M 1 1 0 5 4	$1.1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$
	分離菌株	$9.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$
0.05%Mn 加 標準寒天培地	I A M 1 1 0 5 4	$1.1 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	$8.4 \times 10^3$
	分離菌株	$1.4 \times 10^5$	$9.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
土壌エキス加寒天培地	I A M 1 1 0 5 4	$8.0 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$	$9.3 \times 10^4$
	分離菌株	$1.3 \times 10^5$	$3.1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
ミネラル加寒天培地	I A M 1 1 0 5 4	$1.0 \times 10^5$	$7.1 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$
	分離菌株	$2.7 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$

土壌エキス加寒天培地 (35°C) で, IAM 1110  $2.1 \times 10^5$  /ml 個, 分離菌株  $3.6 \times 10^5$  /ml 個が他の芽胞形成培地より, わずかながら高い値を示したが, ほとんど有意の差は認められなかった。

### Ⅲ *B. licheniformis* の芽胞形成におよぼす温度と培地の培養条件について

表5に芽胞形成におよぼす培養温度と芽胞形成培地の芽胞菌数を示した。温度における培養条件は45°C, 50°C に対し35°C で $10^5$  /ml 個のオーダーと若干, 高い値を示した。また, 4種類の芽胞形成培地では, 土壌エキス加寒天培地 (35°C) における IAM 11054で $8.0 \times 10^5$  /ml 個と高い値を示したが35°C 培養温度

での各種芽胞形成培地に差は認められなかった。

以上の結果から, *B. cereus*, *B. licheniformis* の両菌株とも芽胞形成至適培養温度は35°C 前後が最適であった。そして芽胞形成培地では, 土壌エキス加寒天培地が芽胞形成性が比較的高い結果を示した。

本実験では各温度における培養期間を4日間とした。これは位相差顕微鏡下で芽胞形成が80%以上であることを確認して芽胞菌数測定実験を行った。また, 肉眼でシャーレ中の菌株の発育状態を観察した結果では, 35°C の培養が最も良好な菌集落を形成しており, 50°C 培養にいたっては, ほとんど発育は認められない状態で, 濁度計による50倍希釈液

測定においても、35°C で25～30% に対し、45°C、50°C では60～75% の透過率であった。しかし芽胞数において、前者は $10^5 \sim 10^6$  /ml 個に対し、後者は $10^4 \sim 10^5$  /ml 個とあまり大きな差はみられなかった。

H. Ng, H. G. Bayne<sup>1)</sup> らは耐熱性に対する培養温度と菌齢の影響について検討し、対数期細胞に比べて定常期のものの方が耐熱性は高く、また培養温度では高温で培養した方が栄養細胞も芽胞も耐熱性が大であったことを報告している。また、H. S. Levinson<sup>4)</sup> らは培地中に  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mn}^{++}$  の2価カチオンは蛋白質と結合して強い複合体を生成して耐熱性を増加することを認めている。その一方で、Sugiyama, H.<sup>6)</sup> は最適発育温度で得られた芽胞が最強の耐熱性をもつと述べているが、35°C 培養温度での培養期間が4日間では短く、Sporangium (芽胞を体内にもった栄養型) が多く混在した状態といえる。三輪谷<sup>5)</sup> は endotrophic sporulation 法を用い、*B. cereus* の芽胞齢と芽胞形成の関係を調べ、培養8時間以上の栄養細胞は蒸留水中で一定時間後にほぼ100%芽胞を形成すると報告している。このような方法を利用することにより、より多量の芽胞を得ることが出来ると考えるが、芽胞は内的・外的因子によって耐熱性および発芽条件が変わることが予想されるので、本実験を基礎に今後の芽胞研究を進めて行きたい。

## 要 約

*B. cereus* および *B. licheniformis* の4菌株における芽胞形成におよぼす温度と培地の培養条件について検討を行った。また、香辛料中からの *B. cereus* を分離し、その同定を行った。

1. 昭和57年5月に東京地区で市販されていた黒コショウより *B. cereus* 菌を分離し、

同定を行った結果、レシチナーゼ反応、澱粉分解性、運動性およびVP試験陽性であったので *Bacillus cereus* と同定した。

2. *B. cereus* IAM 1110と上記分離菌株を4種の芽胞形成培地中で35°C、45°C、50°C で4日間培養し、各温度における芽胞菌数を測定した結果、35°C 培養温度が $10^5 \sim 10^6$  /ml 個と高い値を示した。また、4種類の芽胞形成培地間での芽胞数は土壌エキス加寒天培地が、他の培地より若干高い値を示したが、あまり差異は認められなかった。

3. *B. licheniformis* IAM 11054と香辛料からの分離菌株での各培養温度での芽胞数は、35°C 培養温度が他より若干高い値を示した。また、芽胞形成培地間では、土壌エキス加寒天培地 (35°C) が高い値を示し、温度および培地とも *B. cereus* 菌と同様の結果を示した。

最後に、本研究を行うにあたり御指導を賜りました国立衛生試験所 河西勉博士、本学 箕口重義教授に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) H. NG, H. G. BAYNE and J. A. GARIBALDI : Appl. Microbiol., 17, 78 (1969).
- 2) CHARNEY, J. W. • FISHER, W. P. • HEGARTY, C. P. : J. Bact., 62, 145 (1951)
- 3) GORDON, R. E. • SMITH, N. R. : J. Bacteriol., 66, 41 (1953)
- 4) H. S. LEVINSON and M. T. HYATT : J. Bacteriol., 87, 876 (1964)
- 5) 三輪谷俊夫 : 日本細菌学雑誌, 12, 283 (1957)
- 6) SUGIYAMA, H. : J. Bact., 62, 81 (1951)
- 7) 高村一知, 渡部智子 : 聖徳栄養短期大学紀要 Vol 13. 7～13 (1982)